

· 论 著 ·

去卵巢和雌二醇预防性治疗影响大鼠甲状旁腺中 PTH 基因及其关键调控因子的 mRNA 表达

李游山^{1,2*} 张婷婷¹ 朱瑞³ 冯自立² 白瑜¹

1. 陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723001

2. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

3. 陕西理工大学心理健康教育中心, 陕西 汉中 723001

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 05-0625-08

摘要: **目的** 探讨雌激素和甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)在绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)发生、发展中的作用及其调控关系,为女性绝经后骨质疏松症的防治提供理论基础。通过构建去卵巢大鼠骨质疏松模型和雌二醇预防性治疗,分析大鼠甲状旁腺中 PTH 基因及其关键调控因子的 mRNA 表达。**方法** 对去卵巢组(OVX)、雌二醇预防性治疗组(OVX/E₂)和假手术组(Sham)中大鼠的股骨与胫骨进行石蜡组织切片、苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, H&E)和组织形态学观察。利用酶联免疫法和微孔板比色法测定大鼠血清雌激素和血清钙的含量变化。采用 qPCR 技术检测不同处理组间大鼠甲状旁腺中 PTH、ER- α 、CaSR、FGF-23、FGFR1、Klotho 和 Egr1 基因的 mRNA 表达量变化。**结果** 摘除卵巢后大鼠 PTH 的 mRNA 表达量显著降低,而预防性注射一定剂量的 β -雌二醇能够显著提高 PTH 的 mRNA 表达量。研究发现摘除卵巢能显著提高甲状旁腺中 ER- α 的表达量,而雌二醇预防性治疗可以显著降低该基因的表达,提示甲状旁腺组织中的 ER- α 可能介导雌激素对 PTH 的表达调控。不同处理组之间,大鼠甲状旁腺中 CaSR、FGF-23、FGFR1、Klotho 和 Egr1(调控 PTH 表达的潜在通路中的关键基因)的 mRNA 表达量的存在显著性差异,表明去卵巢和雌二醇预防性治疗影响了大鼠甲状旁腺中 PTH 关键调控因子的 mRNA 表达。**结论** 去卵巢和一定剂量的 β -雌二醇预防性给药会影响大鼠 PTH 基因的表达,大鼠甲状旁腺中的 ER- α 、Ca²⁺/CaSR 调控系统以及 FGF-23-Klotho 受体调控系统均可能参与 PTH 基因的表达调控。

关键词: 去卵巢;雌激素;骨质疏松;甲状旁腺素;大鼠

Ovariectomy and prophylactic estrogen therapy affect the mRNA expression of PTH gene and its key regulatory factors in rat parathyroid glands

LI Youshan^{1,2*}, ZHANG Tingting¹, ZHU Rui³, FENG Zili², BAI Yu¹

1. Vitamin D Research Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001

2. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001

3. Mental Health Education Center, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China

* Corresponding author: LI Youshan, Email: li_youshan@snut.edu.cn

Abstract: Objective To explore the role and regulatory relationship of estrogen and parathyroid hormone (PTH) in the occurrence and development of postmenopausal osteoporosis (PMOP), the ovariectomized rat model of osteoporosis was used to analyze the effect of ovariectomy and prophylactic administration of estrogen on the regulation of PTH gene expression in PMOP rats. This will provide a theoretical basis for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis in women. **Methods** The histological morphology of femur and tibia of rats in sham operation (Sham) group, ovariectomized (OVX) group and β -estradiol-treated OVX (OVX/E₂) group was observed in H&E-stained paraffin sections. The changes of serum estrogen and calcium in rats were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microporous plate colorimetry. The mRNA expression of PTH, ER- α , CaSR, FGF-23, FGFR1, Klotho and Egr1 genes in rat parathyroid glands were detected by real-time quantitative PCR

基金项目: 国家自然科学基金(31702187); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2018JQ3057); 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心项目(QBXT-17-1)

* 通信作者: 李游山, Email: li_youshan@snut.edu.cn

(qPCR). **Results** The expression of PTH mRNA in ovariectomized rats was significantly decreased, while the expression of PTH mRNA was significantly increased by prophylactic administration of a certain dose of β -estradiol. It was found that the expression of ER- α was significantly up-regulated in rat parathyroid glands after ovariectomy, but significantly down-regulated after prophylactic administration of β -estradiol. It indicated that ER- α in parathyroid tissues may mediate the regulation of PTH expression by estrogen. The expression of CaSR, FGF-23, FGFR1, Klotho and Egr1, the key genes in the potential regulatory pathway of PTH expression, were significantly up-regulated or down-regulated in the parathyroid glands of rats in different treatment groups. These results suggest that ovariectomy and prophylactic estrogen therapy may affect the mRNA expression of key regulatory factors of PTH expression in the rat parathyroid glands. **Conclusion** Ovariectomy and prophylactic estrogen therapy can affect the expression of PTH gene. Estrogen receptor ER- α , Ca^{2+} /CaSR, and FGF-23-Klotho receptor regulatory system in rat parathyroid glands may participate in regulating PTH gene expression.

Key words: ovariectomy; estrogen; osteoporosis; parathyroid hormone; rat

雌激素缺乏通常被认为是导致绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的主要原因。在小鼠模型中,腹腔注射雌激素-RGD 肽偶联物,可降低血清钙和碱性磷酸酶的浓度,提高小鼠股骨中钙、磷和矿物质的水平^[1]。笔者近期的研究结果表明,对大鼠预防性注射适量的 β -雌二醇(β -estradiol, E_2)后能够较好的防治去卵巢导致的骨质疏松症,而且不会引起子宫等组织的病变^[2]。已有研究^[3-5]表明,甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)在机体骨转换中发挥着重要作用,可以显著改善 PMOP 妇女腰椎、全髋关节、股骨颈的骨密度。PTH 的表达和分泌可能受 Ca^{2+} 浓度、钙敏感受体 CaSR(calcium-sensing receptor)、成纤维细胞生长因子 FGF-23(fibroblast growth factor-23)、FGF-23 受体 FGFR1(fibroblast growth factor receptor 1)及其辅助受体 Klotho 等因素的影响^[6-9]。

雌激素和 PTH 在 PMOP 发生和发展中可能存在着某种联系,但人们对雌激素和 PTH 在 PMOP 发生、发展过程中的作用及调控关系的认识还十分有限,迄今为止尚缺乏雌激素直接调控 PTH 表达的证据。正常状态下的甲状旁腺细胞中是否存在雌激素受体、雌激素与影响 PTH 表达的潜在调控因素之间存在怎样的联系,这些问题都亟待解答。

鉴于此,本研究利用去卵巢大鼠骨质疏松模型,分析去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠 PTH 表达的影响,初步探索甲状旁腺中的 ER- α 、 Ca^{2+} /CaSR 以及 FGF-23/Klotho 受体调控系统中关键基因的表达变化,为女性绝经后骨质疏松症的预防和治疗提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试大鼠和试剂耗材

7 周龄 SD 雌性大鼠(SPF 级)购自第四军医大

学实验动物中心,实验动物质量合格证号为 0032811,许可证号为 SCXK-(军)2012-0007。大鼠由人工饲料喂养,饲养条件:动物房通风良好,12 h 光照/12 h 黑暗,相对湿度 45%~55%,自由进食和饮水。 β -雌二醇购自北京索莱宝科技有限公司;TRI Reagent 购自 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)公司;反转录试剂盒购自 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)公司;SYBR[®] Select Master Mix 购自 Applied Biosystems(Foster City, CA, USA)公司;引物由华大科技(中国深圳)公司合成。

1.2 方法

1.2.1 造模、给药及组织样品采集:参照笔者先前报道^[2]的方法构建绝经后骨质疏松大鼠模型和实施雌二醇预防性治疗。将 18 只饲养至 3 月龄的 SD 雌性大鼠随机分为以下 3 组:去卵巢组(ovariectomized, OVX)、 β -雌二醇预防性给药组(β -estradiol treated OVX, OVX/ E_2)、假手术组(sham-operated, Sham)。经背侧部双切口入路切除 OVX 组和 OVX/ E_2 组大鼠的双侧卵巢,摘除 Sham 组大鼠卵巢周围少许脂肪。术后前 3 天,每日给大鼠肌肉注射 0.2 mL 青霉素 G 钠(50 mg/mL),同时用头孢曲松钠溶液(50 mg/mL)冲洗创面。自术后第 10 天开始,按照 10 $\mu\text{g}(\text{kg} \cdot \text{bw})$ 剂量对 OVX/ E_2 组大鼠皮下注射 β -雌二醇,每日 1 次。对于 OVX 和 Sham 组中的大鼠,则皮下注射等量的溶剂[含有 0.01% (v/v) DMSO 的生理盐水]。连续给药 51 d 后,处死大鼠,采集血液、甲状旁腺、股骨和胫骨。将血液样品于室温下斜面静置 1 h,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,使血清自然析出,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min,离心 10 min,收集上方血清,置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。将甲状旁腺组织用液氮冷冻处理后,置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。首先将不同处理组大鼠的骨组织置于 4% 的多聚甲醛中,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h,接着依次用 25%、50%、

75%的乙醇进行梯度脱水,最后置于75%的乙醇中保存。

1.2.2 股骨、胫骨的组织形态学观察:首先将固定后的股骨和胫骨转移至10%的EDTA溶液(pH 8.0)中,4℃脱钙20 d。接着依次用75%、80%、95%、100%的乙醇进行组织脱水,然后开展二甲苯透明、石蜡包埋、组织切片和H&E染色,最后于光学显微镜下观察股骨和胫骨的形态结构。

1.2.3 血清雌激素的测定:参照大鼠雌激素酶联免疫分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(厦门慧嘉生物科技有限公司)的使用说明书,准备不同浓度(0、2、4、8、16、32、48 ng/L)的标准样品和5倍稀释后的待测血清样品。取50 μL样品至包被有抗体的96孔板中,37℃孵育30 min。空白对照孔中则加入50 μL样品稀释液。然后依次进行洗涤、酶标试剂孵育、洗涤、显色和终止显色反应,最后利用BioTek Epoch全波长酶标仪在450 nm处进行检测,以空白对照调零,计算不同处理组的大鼠血清中的雌激素含量。

1.2.4 血清钙含量测定:参照微孔板法钙试剂盒(南京建成生物工程研究所)的使用说明书,以梯度稀释法配制不同浓度的标准样品。分别取10 μL不同浓度的标准样品和2.5倍稀释后的待测血清样品

至96孔板中,以等体积的ddH₂O作为空白对照。接着加入250 μL工作液,静置5 min后测定610 nm处各孔的吸光值,进而计算血清钙的含量。

1.2.5 实时定量PCR:参照厂家提供的使用说明书,利用TRIzol试剂提取不同处理组的大鼠甲状旁腺的总RNA。对RNA溶液进行吸光度检测和RNA凝胶电泳,以保证总RNA的质量。利用M-MLV反转录酶将0.6 μg RNA反转录成cDNA。基于NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用Primer Premier 5.0软件设计大鼠GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-磷酸甘油醛脱氢酶)、PTH、ER-α、CaSR、FGF-23、FGFR1、Klotho和Egr1(early growth response gene 1,早期生长反应基因1)的定量引物(表1)。以大鼠GAPDH基因作为内参基因。以不同处理组的大鼠甲状旁腺cDNA为模板,利用Step One Plus™ PCR仪(Applied Biosystems)进行实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)检测。反应体系为:SYBR Green 预混液10 μL,正向引物(4 μmol/L)1 μL,反向引物(4 μmol/L)1 μL, cDNA模板1 μL,灭菌水7 μL。扩增程序为:50℃ 2 min; 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40个循环。用2^{-ΔΔCt}法计算靶基因mRNA的相对表达量^[10]。

表1 qPCR反应引物
Table 1 Primers for qPCR

Genes	Forward sequence (5' → 3')	Reverse sequence (5' → 3')	Product Length (bp)
GAPDH	GCAACTCCCATTTCTCCACC	CATACCAGGAAATGAGCTTCACAA	81
PTH	GGAAATGTCTTGTGATGGC	TGTTATTGCTCAGCAGCGTCTAG	127
ER-α	GGCTGCGCAAGTGTACGAA	CATTTCGGCCTTCCAAGTCAT	114
CaSR	TGACGAGCCTCAGAAGAATGC	CACAGAGCTACCTCCACCACTAA	277
FGF-23	TTGGATCGTATCACTTCAGC	TGCTTCGGTGACAGGTAG	88
FGFR1	TGGACCTGAGGCATTGTT	AAGAGCACCCAAAAGACCAC	70
Klotho	CCATGCCGAGCAAGACTCA	CCGTCCAACACGTAGGCTTT	81
Egr1	TACGAGCACCTGACCACAGACT	GCTGGATAACTTGTCTCCACC	81

1.3 统计学分析

利用SPSS 20.0软件的对数据进行单因素组间方差分析,评估各组间的统计学意义。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns $P > 0.05$ 。其中血清雌激素和血清钙测定实验中 $n = 6$, qPCR 实验中 $n = 3$ 。

2 结果与分析

2.1 去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠股骨和胫骨组织形态的影响

探讨雌激素和PTH在绝经后骨质疏松症发生和发展中的内在联系,首先需对供试大鼠进行双侧

卵巢摘除手术,并于术后适时进行一定剂量的β-雌二醇预防性治疗。为了分析去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠股骨和胫骨组织形态的影响,笔者利用石蜡切片HE染色法对各处理组大鼠的股骨和胫骨进行组织形态学观察。结果显示(图1),相比较于Sham组,OVX组大鼠的股骨和胫骨均出现骨小梁断裂、间距变大、结构紊乱等骨质疏松症状,而OVX/E₂组大鼠并未出现明显的病理症状。这表明摘除卵巢后引起的卵巢功能缺失可导致大鼠绝经后早期骨质疏松形成,而一定剂量的雌二醇预防性治疗能够较好的预防骨质疏松症的发生。

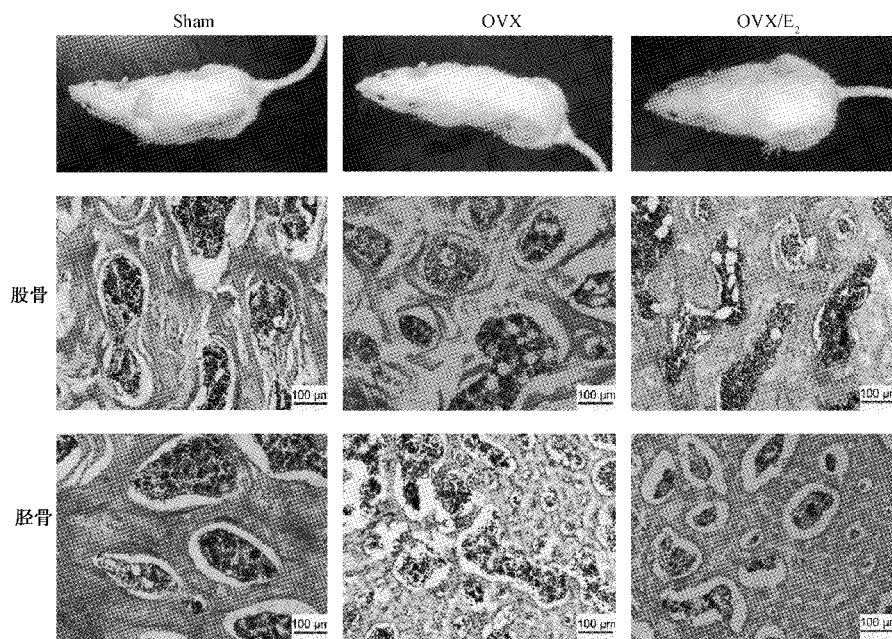


图1 不同处理组大鼠股骨和胫骨的组织形态

Fig.1 The histological morphology of femur and tibia in different treated rats

注:BM:骨髓腔;TB:骨小梁

2.2 去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠 PTH 的 mRNA 水平的影响

为了探讨去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠 PTH 基因表达的影响,笔者利用 qPCR 对不同处理组的大鼠甲状旁腺中 PTH 的 mRNA 表达量进行分析。如图 2 所示,摘除卵巢后大鼠 PTH 的 mRNA 表达量显著降低,而预防性注射一定剂量的 β -雌二醇能够显著提高 PTH 的 mRNA 表达量,提示 PTH 含量不足与绝经后骨质疏松症的发生存在着一定的联系。

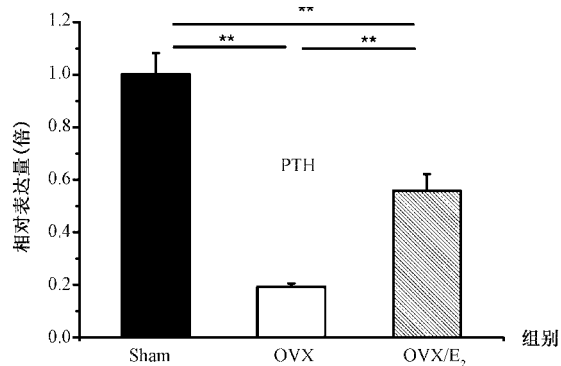


图2 不同处理组大鼠甲状旁腺中 PTH 基因的表达变化 ($n=3$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$)

Fig.2 Changes of PTH gene expression in parathyroid gland of rats in different treatment groups ($n=3$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$)

2.3 不同处理组中大鼠血清雌激素和甲状旁腺中 ER- α 的表达变化

为了探讨不同处理组间大鼠 PTH 基因的表达变化是否与血清雌激素含量变化有关,笔者利用 ELISA 技术分析去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠血清中雌激素含量的影响。如图 3A 所示,血清雌激素含量在各处理大鼠之间均无显著性差异,在供试时间范围内摘除卵巢并未引起血清雌激素含量的明显降低,雌二醇给药也没有引起血清雌激素水平的显著升高。

为了进一步分析大鼠甲状旁腺中雌激素受体 ER- α ,去卵巢和雌二醇预防性给药能否影响 ER- α 的表达,笔者利用 qPCR 技术对 ER- α 在不同处理大鼠甲状旁腺中表达情况进行分析(图 3B)。与 Sham 组相比,摘除卵巢可在一定程度上提高大鼠甲状旁腺中的 ER- α mRNA 的表达量,而 β -雌二醇预防性给药能够显著降低大鼠甲状旁腺中的 ER- α mRNA 表达量,提示甲状旁腺中的 ER- α 可能介导雌激素对 PTH 基因的表达调控。

2.4 去卵巢和雌二醇预防性治疗对甲状旁腺中 Ca^{2+} /CaSR 的影响

已有研究^[11-13]表明,甲状旁腺细胞能够通过细胞膜上的 CaSR 感知胞外 Ca^{2+} 的微小变化,及时调节 PTH 的表达和分泌。为了研究去卵巢和雌二醇预防性治疗对甲状旁腺中 Ca^{2+} /CaSR 调控系统的影

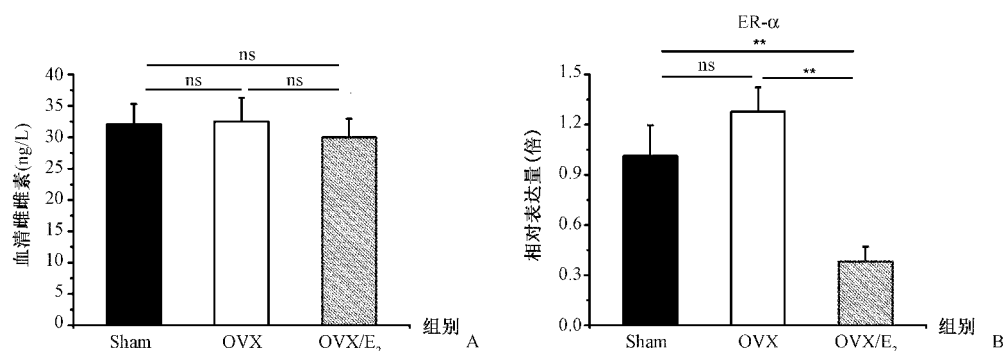


图3 不同处理组中大鼠血清雌激素和甲状旁腺中 ER- α 的表达变化 A:去卵巢和雌二醇预防性治疗大鼠血清雌激素水平的影响($n=6$);B:不同处理组大鼠的甲状旁腺中 ER- α mRNA 表达分析($n=3$); * $P<0.05$; ** $P<0.01$;“ns”表示无统计学意义。

Fig.3 Changes of serum estrogen and ER- α expression in parathyroid glands of rats in different treatment groups

A: Effects of ovariectomy and prophylactic estrogen therapy on serum estradiol levels of rats ($n=6$); B: ER- α mRNA expression in parathyroid gland of rat in different treatment groups ($n=3$); * $P<0.05$; ** $P<0.01$; “ns” means no significant difference.

响,笔者分析了不同处理组中大鼠的血钙浓度和甲状旁腺中 CaSR 的 mRNA 水平。如图 4A 所示,发现 OVX/E₂ 组大鼠的血钙水平显著高于 Sham 组,但是 Sham 组与 OVX 组、OVX 组与 OVX/E₂ 组之间的差异均无统计学意义。qPCR 结果显示,大鼠甲状旁腺中 CaSR mRNA 的表达量在摘除卵巢后显著降低,而在雌二醇预防性给药后显著上调(图 4B)。

2.5 去卵巢和雌二醇预防性治疗对甲状旁腺中 FGF-23/Klotho 受体调控系统的影响

前人研究^[9]表明,Klotho 是 FGF-23 的辅助受体,甲状旁腺中的 FGFR1/Klotho 受体系统及 MAPK 途径能够介导 FGF-23 对 PTH 基因表达的抑制作用。为了研究去卵巢和雌二醇预防性治疗对大鼠甲状旁腺中 FGF-23-Klotho 受体调控系统的影响,笔者利用 qPCR 技术分析该调控系统中的关键因子 FGF-23、FGFR1、Klotho 和 Egr1 表达量。结果显示,

摘除卵巢能够显著降低甲状旁腺中 FGF-23、FGFR1 和 Klotho 的 mRNA 表达量,而雌二醇预防性治疗可以显著提高 FGFR1 的 mRNA 表达量,却进一步下调 FGF-23 和 Klotho 的 mRNA 表达(图 5A~C)。对 MAPK 途径的标记基因 Egr1 的进一步分析显示,甲状旁腺中 Egr1 mRNA 的表达量在不同处理组间存在显著性差异。OVX 组 Egr1 的 mRNA 表达量显著低于 Sham 组,却显著高于 OVX/E₂ 组(图 5D)。上述结果表明,摘除大鼠双侧卵巢可能会降低甲状旁腺中 FGF-23-Klotho 系统对 PTH 表达的抑制作用,而雌二醇预防性治疗可进一步降低该受体调控系统的对 PTH 的调控作用。

3 讨论

前期研究认为,卵巢功能衰退造成的雌激素分泌不足是引发女性绝经后骨质疏松症的重要原因。

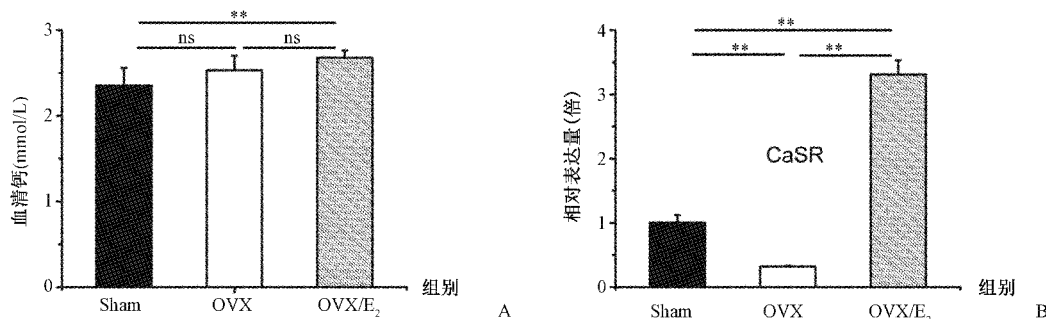


图4 不同处理组间大鼠血清钙(A)和甲状旁腺中 CaSR 表达(B)的变化($n=3$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$;“ns”表示差异无统计学意义)

Fig.4 Changes of serum Ca(A) and CaSR expression in parathyroid glands(B) of rats in different treatment groups($n=3$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; “ns” means no significant difference)

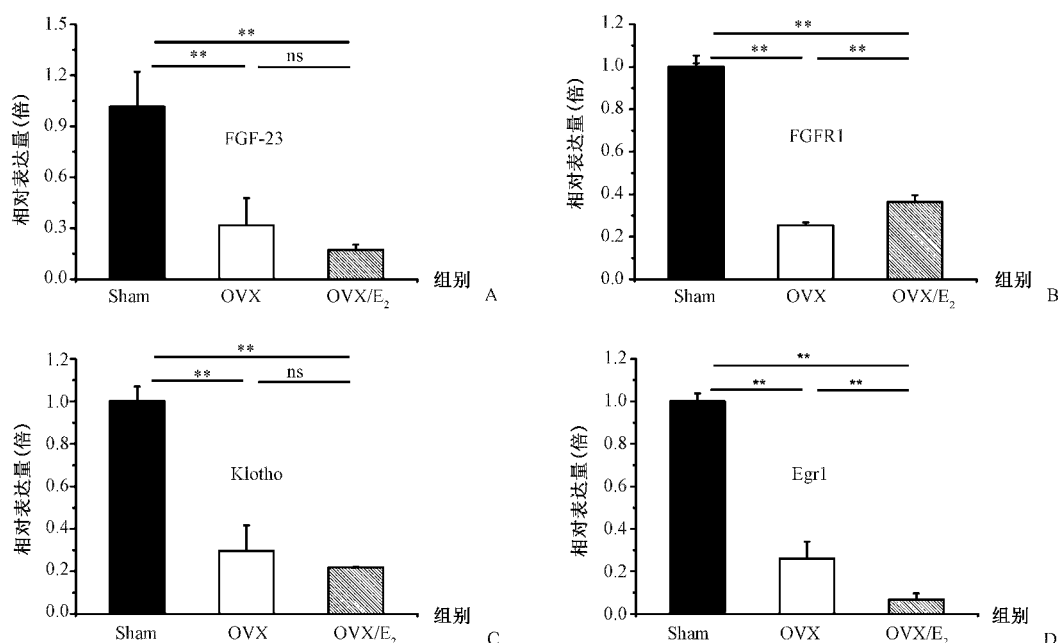


图5 不同处理组大鼠的甲状旁腺中 FGF-23 (A)、FGFR1 (B)、Klotho (C) 和 Egr1 (D) 的表达分析 ($n=3$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; “ns”表示差异无统计学意义)

Fig.5 Expression of FGF-23 (A), FGFR1 (B), Klotho (C) and Egr1 (D) in parathyroid glands of rats in different treatment groups ($n=3$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; “ns” means no significant difference)

因此,通过切除大鼠双侧卵巢来降低血清雌激素水平被视为建立绝经后骨质疏松动物模型的有效途径之一。然而,笔者的研究发现 Sham、OVX、OVX/E₂ 组大鼠的血清雌激素含量之间没有显著性差异,摘除卵巢并未引起大鼠血清雌激素水平显著降低,雌二醇预防性治疗也未能显著提高血清雌激素水平,这可能与术后时间较短,肾上腺皮质应激性的合成雌激素有关。沈耿杨等^[14]对去卵巢后不同时期的大鼠骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律进行分析,结果发现在术后 12 周内大鼠血清中雌激素呈先升高后降低的变化趋势,去卵巢 4 周后,OVX 组股骨骨矿含量和骨密度均较 Sham 显著降低,但其血清雌激素含量与 Sham 组之间并无显著性差异,这与此次研究结果基本一致。另有研究^[15]表明,低剂量的 β -雌二醇给药能够部分抵偿雌激素的应激性合成,且较小剂量的雌激素给药既能产生较强的抵偿效应。此次研究结果表明,雌激素预防性治疗并为引起血清雌激素水平的显著升高,这可能与雌二醇给药的引起的雌激素抵偿效应有关。在供试时间内,相较于 Sham 组大鼠而言,OVX 大鼠的雌激素水平并未显著降低,但其股骨和胫骨组织中均出现典型的骨质疏松症状,提示女性绝经早期出现的骨质疏松症可能并非由雌激素水平分泌不足导致,卵

巢摘除引起的卵巢整体功能减退可能是 OVX 大鼠早期骨质疏松症发生的主要原因,其具体机制仍需进一步探讨。

组织和细胞中是否存在 ER 决定着其能否响应雌激素作用,雌激素受体 ER β 1 和 ER β 2 广泛分布于卵巢、子宫、空肠、甲状腺、肾皮质、骨髓间质和梁小骨等组织器官中^[16]。研究^[17-18]表明,雌激素能够通过骨中的雌激素受体(ER)来阻断 PKA 途径,进而抑制 PTH 诱导的破骨细胞的形成。有研究^[19]证实雌激素受体 ER β 1 和 ER β 2 广泛表达于甲状旁腺肿瘤中,ER β 1 激活可引发甲状旁腺相关基因 CaSR、VDR、JUN、CALR 和 ORAI2 等基因的转录水平变化,提示甲状旁腺功能的实现与雌激素信号传导密切相关。迄今为止,正常大鼠甲状旁腺中是否存在雌激素受体尚不完全清楚。笔者的研究发现,大鼠甲状旁腺中存在 ER- α ,去卵巢和雌二醇预防性治疗可改变大鼠甲状旁腺中 ER- α 基因的表达量,调节局部雌激素信号传导,进而影响 PTH 的表达和分泌。

CaSR 属于 G 蛋白偶联受体第三超家族,其在机体 Ca²⁺稳态中起重要的作用。研究^[11-12]发现,甲状旁腺细胞能够通过细胞膜上的 CaSR 能够使感知胞外 Ca²⁺的信号变化,及时调节 PTH 的表达和分泌。细胞外 Ca²⁺水平降低会导致甲状旁腺中 CaSR 的活化减

少和PTH的释放增加,反之则会增加CaSR的活化,抑制PTH的表达^[6]。笔者的研究发现,尽管OVX组大鼠股骨和胫骨发生了骨质疏松,但OVX组大鼠血清Ca²⁺水平相较于Sham组略有升高,两组之间差异并无统计学意义,这与谢肇等^[20]的研究结果是一致的。有研究^[14, 20-21]显示,摘除卵巢后大鼠骨量先快速降低,然后缓慢回升,而血清钙浓度表现为先升后降的变化趋势。卵巢摘除导致甲状旁腺中PTH和CaSR的表达量降低,预防性注射β-雌二醇则引起PTH和CaSR表达量升高,提示CaSR受体可能参与调节PTH的表达,但具体机制尚不明确。

在正常机体中,FGF-23是通过其受体FGFR1/Klotho降低PTH的表达,增加CaSR和VDR的表达量^[22]。有研究^[23]报道,慢性肾病患者血液中FGF-23水平的增加,并不能降低PTH的表达量,原因是FGFR1/Klotho受体复合物下调,引起甲状旁腺细胞对FGF-23的抵抗。本次研究发现去卵巢后FGF-23、FGFR1、Klotho及MAPK途径的标志物Egr1表达量显著下调,雌二醇预防性治疗后FGF-23、Klotho和Egr1的表达量进一步降低,说明去卵巢后的FGF-23/Klotho受体调控系统抑制PTH表达的能力降低,并且短期内预防性注射β-雌二醇后其抑制PTH表达的能力继续降低。

本次研究发现去卵巢和雌二醇预防性治疗会影响PTH基因的表达,雌激素受体ER-α、Ca²⁺/CaSR调控系统以及FGF-23-Klotho受体调控系统均可能参与PTH的基因表达调控。需要指出的是,机体PTH的表达调控是一个复杂的过程,不排除去卵巢和雌二醇预防性治疗通过改变其他调节因子的水平而影响PTH的表达分泌。该研究不仅有助于阐明雌激素和PTH在绝经后骨质疏松症发生和发展中的调控关系,而且对女性绝经后骨质疏松症的预防和治疗也具有一定的指导意义。

【参 考 文 献】

- [1] Xiong Y, Zhao M, Wang C, et al. Improved anti-osteoporosis potency and reduced endometrial membrane hyperplasia during hormone replacement therapy with estrogen-RGD peptide conjugates[J]. J Med Chem, 2007, 50(14): 3340-3353.
- [2] 张婷婷, 李游山, 白瑜, 等. 雌激素预防性给药对去卵巢大鼠骨和脏器的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(12): 1541-1545, 1555.
- [3] Ascenzi MG, Liao VP, Lee BM, et al. Parathyroid hormone treatment improves the cortical bone microstructure by improving the distribution of type I collagen in postmenopausal women with osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(3): 702-712.
- [4] Pepe J, Cipriani C, Cantatore FP, et al. The effect of parathyroid hormone (1-84) treatment on serum bone morphogenetic protein 4 and vascular endothelial growth factor in postmenopausal women with established osteoporosis[J]. J Endocrinol Invest, 2017, 40(6): 663-667.
- [5] Song J, Jin Z, Chang F, et al. Single and combined use of human parathyroid hormone (PTH) (1-34) on areal bone mineral density (aBMD) in postmenopausal women with osteoporosis: evidence based on 9 RCTs[J]. Med Sci Monit, 2014(20): 2624-2632.
- [6] Goltzman D, Hendy GN. The calcium-sensing receptor in bone--mechanistic and therapeutic insights[J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(5): 298-307.
- [7] Kato S, Kim MS, Yamaoka K, et al. Mechanisms of transcriptional repression by 1,25(OH)₂ vitamin D[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007, 16(4): 297-304.
- [8] Kim MS, Fujiki R, Murayama A, et al. 1α, 25(OH)₂D₃-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(2): 334-342.
- [9] Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats[J]. J Clin Invest, 2007, 117(12): 4003-4008.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid[J]. Nature, 1993, 366(6455): 575-580.
- [12] Reyes-Ibarra AP, Garcia-Regalado A, Ramirez-Rangel I, et al. Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via a Rab11a-dependent and AMSh-sensitive mechanism[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(6): 1394-1407.
- [13] Fan Y, Liu W, Bi R, et al. Interrelated role of Klotho and calcium-sensing receptor in parathyroid hormone synthesis and parathyroid hyperplasia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(16): E3749-E3758.
- [14] 沈耿杨, 任辉, 江晓兵, 等. 去卵巢大鼠不同时期骨量、骨转换指标、雌激素水平的变化规律及相关性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(2): 170-176.
- [15] 赵秀丽, 贾三庆. 雌激素与冠心病[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997.
- [16] Lim SK, Won YJ, Lee HC, et al. A PCR analysis of ERα and ERβ mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(7): 1189-1196.
- [17] Stock JL, Coderre JA, Burke EM, et al. Identification of estrogen receptor mRNA and the estrogen modulation of parathyroid hormone-stimulated cyclic AMP accumulation in opossum kidney cells[J]. J Cell Physiol, 1992, 150(3): 517-525.

L5、全髋部骨密度呈正相关,而与 L1、L2、L3、股骨颈、股骨转子间骨密度无明显相关性。此研究结果分析可能与本研究样本量较小有关,但仍然说明老年男性 T2DM 患者双下肢微循环病变与骨质疏松之间可能存在相关性,可能是导致 OP 发生的危险因素,但还需较大样本量的研究进一步证明两者的关系。

总之,本研究证明及早发现糖尿病下肢微循环病变有助于及早预防骨质疏松疾病。

【参 考 文 献】

- [1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
 - [2] Hennemann A. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy [J]. Med Monatsschr Pharm, 2002, 25(5): 164-167.
 - [3] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 版) [J]. 中华糖尿病志, 2018, 10(1): 4-67.
 - [4] Kageyama G. The diagnosis and treatment of osteoporosis [J]. Rinsho Byori, 2015, 63(5): 570-579.
 - [5] Villa CR, Ward WE, Comelli EM. Gut Microbiota-bone axis [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(8): 1664-1670.
 - [6] Gong L, Zhao Y, Zhang Y, et al. The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro [J]. Ann Clin Lab Sci, 2016, 46(1): 65.
 - [7] D'Amelio P, Sassi F. Osteoimmunology: from mice to humans [J]. Bonekey Rep, 2016, 5: 802-806.
 - [8] Shanbhogue VV, Mitchell DM, Rosen CJ, et al. Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2016, 4(2): 159-173.
 - [9] Wang L, Li Q, Du J, et al. Advanced glycation end products induce moesin phosphorylation in murine retinal endothelium [J]. Acta Diabetol, 2012, 49(1): 47-55.
 - [10] 段志胜. 2 型糖尿病患者骨质疏松与动脉粥样硬化发病机理探讨 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(9): 1006-1010.
 - [11] Pittas AG, Lau J, Hu FB, et al. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92: 2017-2029.
 - [12] Solida M, Hua S, Frances A et al. Differential expression of genes in the calcium-signaling pathway underlies lesion development in the LDb mouse model of atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1): 40-51.
 - [13] Yuan Z, Miyoshi T, Bao Y, et al. Microarray analysis of gene expression in mouse aorta reveals role of the calcium signaling pathway in control of atherosclerosis susceptibility [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296: 1336-1343.
 - (收稿日期: 2018-07-17; 修回日期: 2018-08-23)
-
- (上接第 631 页)
- [18] Kanatani M, Sugimoto T, Takahashi Y, et al. Estrogen via the estrogen receptor blocks cAMP-mediated parathyroid hormone (PTH)-stimulated osteoclast formation [J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(5): 854-862.
 - [19] Haglund F, Ma R, Huss M, et al. Evidence of a functional estrogen receptor in parathyroid adenomas [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(12): 4631-4639.
 - [20] 谢肇, 李起鸿, 孟萍, 等. 去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(28): 79-81.
 - [21] 朱彤彤, 黄连弟, 李俊玮, 等. 淫羊藿苷对去卵巢大鼠骨质疏松症的保护作用及其机制 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2016, 42(5): 915-919.
 - [22] Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(7): 1125-1135.
 - [23] Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, et al. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2010, 77(3): 211-218.
 - (收稿日期: 2018-08-23; 修回日期: 2018-09-23)